

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of :

Isabelle AHRENS-FATH et al.

Serial No. : 09/997,267

Filed : November 30, 2001

For : NEW HUMAN ANDROGEN RECEPTOR VARIANTS



**SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT(S)**

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D. C. 20231

Sir:

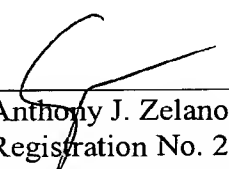
Submitted herewith is a certified copy of each of the below-identified document(s),  
benefit of priority of each of which is claimed under U.S.C. § 119:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO.</u>	<u>FILING DATE</u>
Germany	10061161.3	November 30, 2000

Acknowledgment of the receipt of the above document(s) is requested.

No fee is believed to be due in association with this filing, however, the Commissioner is hereby authorized to charge fees under 37 CFR 1.16 and 1.17 which may be required to facilitate this filing, or credit any overpayment to Deposit Account #13-3402.

Respectfully submitted,

  
\_\_\_\_\_  
Anthony J. Zelano  
Registration No. 27,969  
Attorney for Applicants

MILLEN, WHITE, ZELANO  
& BRANIGAN, P.C.  
Arlington Courthouse Plaza I  
2200 Clarendon Blvd. Suite 1400  
Arlington, Virginia 22201  
Telephone: (703) 243-6333  
Facsimile: (703) 243-6410

Attorney Docket No.: SCH-1793

Date: June 6, 2002



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 61 161.3  
**Anmeldetag:** 30. November 2000  
**Anmelder/Inhaber:** Schering Aktiengesellschaft,  
Berlin/DE  
**Bezeichnung:** Neue humane Androgenrezeptor-Varianten  
**IPC:** C 07 K, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 29. November 2001  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

Dzierzon

## 5 Neue humane Androgenrezeptor-Varianten

Die Erfindung betrifft zwei neue Varianten des Androgenrezeptors und ihre Verwendung.

Androgene sind die männlichen Geschlechtshormone und werden hauptsächlich im Hoden produziert (Roy, A. K. et al., Vitam. Horm. 1999, 55, 309-352). Sie steuern die männliche sexuelle Differenzierung und sind für die Spermatogenese essentiell. Weiterhin sind Androgene für die Ausprägung der sekundären Geschlechtsmerkmale und das sexuelle Verhaltensmuster verantwortlich. Androgene spielen auch eine essentielle Rolle in der Entstehung und Vermehrung von Prostata- und Hodenkrebs (Craft, N. und Sawyers, C. L., Cancer Metastasis Rev. 1998-99, 17, 421-427; Rajpert-De Meyts E. und Skakkebaek, N. E., Eur. Urol. 1993, 23, 54-59).

Androgene wirken durch Bindung an einen spezifischen Kernrezeptor, den Androgenrezeptor. Der bereits bekannte Androgenrezeptor ist ein Ligand-abhängiger Transkriptionsfaktor, der eine Ligandenbindungsstelle, eine DNA-Bindungsstelle und mehrere Transaktivierungsfunktionen besitzt (Lindzey, J. et al., Vitam. Horm. 1994, 49, 383-432). Die Haupttransaktivierungsfunktion befindet sich in der N-terminalen Hälfte, die vom Exon 1 des Androgenrezeptorgens kodiert wird. Wenn der Ligand, ein Androgen, bindet, ändert sich die Konformation des Rezeptors. Durch diese Konformationsänderung kann der Rezeptor ein Dimer bilden und an eine spezifische doppelsträngige DNA Sequenz binden, die Steroid-Response Element heißt. Durch Interaktionen mit Koaktivatoren und anderen Transkriptionsfaktoren wird die Transkription des Zielgens aktiviert (Lindzey, J. et al., Vitam. Horm. 1994, 49, 383-432).

Androgene spielen eine Rolle bei Hormon-abhängigen Tumoren. So wird z.B. Prostatakrebs mit Antiandrogenen, die mit der Bindung der natürlichen Androgene an den Androgenrezeptor kompetieren, behandelt. Hierbei zeigt sich häufig, daß die Antiandrogene nach einer gewissen Behandlungszeit nicht mehr wirksam sind (Crawford, E. D. et al., Urology 1999, 54, 1-7). Als Ursachen für diese Therapieresistenz wurden Mutationen des Androgenrezeptors, die eine Stimulierung durch Antiandrogene bzw. durch Estrogene oder Glucocorticoide erlauben (Brinkmann, A. O. und Trapman, J., Nature Med. 2000, 6, 628-629), postuliert. Diese Mutationen kommen allerdings relativ selten vor. Eine weitere mögliche Ursache ist eine Amplifizierung des Androgenrezeptorgens, wie in etwa 28% der androgenresistenten Patienten beschrieben (Koivisto, P. et al., Cancer Res. 1997, 57, 314-319). Damit können bei weitem nicht alle Fälle erklärt werden. Für eine erfolgreiche Tumor-Therapie ist es deshalb wünschenswert, einen weiteren Angriffspunkt für die Therapie zu kennen.

5

Dieses Problem wurde gelöst durch die Bereitstellung von zwei neuen Varianten des Androgenrezeptors.

10

Der erste erfindungsgemäße Androgenrezeptor mit der in Seq ID NO 2 angegebenen Aminosäuresequenz wird im folgenden AR42 genannt und der erfindungsgemäße Androgenrezeptor mit der in Seq ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz wird AR32 genannt. Der bereits bekannte Androgenrezeptor (Lubahn, D. B. et al., Science 1988, 240, 327-330; Chang et al., Science 1988, 240, 324-326) hat im folgenden die Bezeichnung AR.

15

Die Sequenzen von AR und AR42 stimmen im Bereich der DNA-bindenden Domäne, der sogenannten „hinge“-Domäne und der Liganden-bindenden Domäne überein (s. Exons 2-8 in FIG.1). Sie unterscheiden sich im Bereich des N-Terminus. Während der AR hier eine etwa 537 Aminosäure-lange Transaktivierungsdomäne hat, besitzt der AR42 hier einen nur 7 Aminosäure-langen Bereich, dessen Sequenz unterschiedlich zu der Sequenz der Transaktivierungsdomäne des AR ist. Dieser 7 Aminosäure-lange Bereich ist in der genomischen Sequenz in keinem bisher bekannten Exon enthalten; vielmehr ist er Bestandteil eines DNA-Bereichs, der bisher als nicht translatiert galt.

20

25

Der AR32 unterscheidet sich vom AR im N-Terminus und im C-Terminus (s. Exons 1, 7 und 8 in FIG.1). Der AR32 hat die gleiche N-terminale Sequenz wie AR42. Er unterscheidet sich vom AR42 und vom AR im C-Terminus. Seine C-terminale Sequenz ist kürzer und 10 Aminosäuren sind unterschiedlich verglichen mit AR42 und AR.

30

Die erfindungsgemäßen AR42 und AR32 sind in verschiedenen Geweben von gesunden Menschen exprimiert. AR42 ist besonders stark im Herzen exprimiert (FIG. 2).

35

Die erfindungsgemäßen AR42 und AR32 können Androgen und andere Liganden binden. Nach Bindung eines Liganden können AR42 und AR32 Homodimere (AR42/AR42 oder AR32/AR32) oder untereinander oder mit dem AR Heterodimere (AR42/AR oder AR32/AR) bilden. Die Homodimere können zwar an das Steroid- Response Element des AR binden; sie können jedoch nicht die Transkription von den Zielgenen aktivieren, die der AR aktiviert. AR42 und AR32 wirken dann als Repressor für den AR. Durch eine Heterodimer-Bildung mit dem AR kann die Aktivität des AR moduliert werden. Ob es sich um eine Inhibierung oder Aktivierung handelt, hängt von den Zielgenen ab. Eine Aktivierung der Expression erfolgt bei den

- 5 Zielgenen, deren Expression durch eine Interaktion des AR mit Ets-Transkriptionsfaktoren blockiert ist. Diese Ets-Transkriptionsfaktoren fungieren als Corepressoren für den AR durch Bindung an dessen N-Terminus (Schneikert J. et al., J. Biol. Chem. 1996, 271, 23907-23913). Dagegen können sie nicht an den AR42 oder AR32 binden. Dadurch wird die Blockierung aufgehoben und die Expression stimuliert.

10

Die Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für einen Androgenrezeptor kodieren, wobei sie

- a. die in Seq ID NO 1 und/oder 3 dargestellten Nukleotidsequenzen,
- b. eine der Sequenz aus a. im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz oder
- 15 c. eine mit den Sequenzen aus a. und/oder b. unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz

umfassen.

- 20 Der Begriff "Hybridisierung unter stringenten Bedingungen" gemäß der vorliegenden Erfindung wird bei Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) definiert. Ein stringente Hybridisierung liegt beispielsweise vor, wenn nach dem Waschen für 1 h mit 1 x SSC und 0,1%SDS bei 50°C, vorzugsweise bei 55°C, besonders bevorzugt bei 62°C und am meisten bevorzugt bei 68°C, insbesondere für 1h in 0,2
- 25 x SSC und 0,1 % SDS bei 55°C, vorzugsweise bei 62°C und am meisten bevorzugt bei 68°C noch ein Hybridisierungssignal beobachtet wird. Die Nukleinsäuren, die unter diesen Bedingungen mit der in Seq.ID NO 1 und/oder 3 gezeigten Nukleinsäure oder einer dieser
- Sequenz im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz hybridisiert, sind auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

30

Nukleinsäuren können einzel- oder doppelsträngige DNA, z.B. cDNA, oder RNA, z.B. mRNA, cRNA, pre-mRNA darstellen.

35

Bevorzugt sind die Nukleinsäuren, die einen Protein kodierenden Abschnitt der in Seq ID NO 1 oder/und 3 dargestellten Nukleinsäuresequenzen umfassen. Ein Protein kodierender Abschnitt der in Seq ID NO 1 dargestellten Sequenz liegt im Bereich von Nukleotid 163 bis 1329 und ein Protein kodierender Abschnitt der in Seq ID NO 3 dargestellten Sequenz liegt im Bereich von Nukleotid NO 163 bis NO 1047.

5

Gegenstand der Erfindung sind ferner Nukleinsäuren, die für ein Polypeptid mit der in Seq ID NO 2 oder/und 4 dargestellten Aminosäuresequenz kodieren.

10

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren sind aus Säugern, z.B. humanen Zellen oder aus einer cDNA-Bibliothek oder einer genomischen Bibliothek, die z.B. aus menschlichen Zellen gewonnen wird, erhältlich. Sie können nach bekannten Techniken unter Verwendung kurzer Abschnitte der in Seq ID NO 1 und 3 gezeigten Nukleinsäuresequenzen als Hybridisierungssonden oder Amplifikationsprimer isoliert werden. Besonders bevorzugt sind solche Abschnitte, die für die in Seq ID NO 5 oder 6 dargestellten Peptidsequenzen kodieren.

15

Die Erfindung betrifft weiterhin Polypeptide, die von einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure kodiert werden. Diese Polypeptide haben die Funktion eines Androgenrezeptors.

Weiterhin sind Gegenstand der Erfindung Polypeptide, die die in Seq ID NO 2 oder 4 dargestellte Aminosäuresequenz umfassen.

20

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können rekombinante Polypeptide, natürliche, isolierte Polypeptide oder synthetische Polypeptide sein.

25

Ferner betrifft die Erfindung Peptide, die die in Seq ID NO 5 dargestellte Sequenz umfassen. Die in Seq ID NO 5 dargestellte Sequenz entspricht dem C-Terminus (Aminosäure 285-294) von AR32.

30

Die Erfindung betrifft auch Peptide, die die in Seq ID NO 6 dargestellte Aminosäuresequenz umfassen. Die in Seq ID NO 6 dargestellte Aminosäuresequenz entspricht dem N-Terminus (Aminosäure 1-7) von AR42 und AR32.

35

Die erfindungsgemäßen Polypeptide und die erfindungsgemäßen Peptide können zur Herstellung von Antikörpern verwendet werden. Zur Herstellung polyklonaler Antikörper können die Peptide z.B. an KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) gebunden werden und Tieren, z.B. Kaninchen, gespritzt werden. Sie können auch zur Herstellung monoklonaler Antikörper verwendet werden. Zur Antikörperherstellung kann ein erfindungsgemäßes Peptid oder eine Mischung mehrerer erfindungsgemäßer Peptide verwendet werden. Die Herstellung der Antikörpern erfolgt dabei nach Standardverfahren wie sie z.B. in Kohler, G. und Milstein, C.,

- 5 Nature 1975, 256, 495-497 und Nelson, P. N. et al., Mol. Pathol. 2000, 53, 111-117 beschrieben sind.

Gegenstand der Erfindung sind auch die Antikörper, die gegen ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder gegen ein erfindungsgemäßes Peptid gerichtet sind.

10

Die erfindungsgemäßen Antikörper können zur Detektion der erfindungsgemäßen AR42 und AR32 verwendet werden. Dies kann z.B. durch Immunhistochemie erfolgen. Bevorzugt ist der Nachweis der erfindungsgemäßen Polypeptide in Tumorgewebe besonders in Gewebe von Prostata Tumoren. So kann festgestellt werden, ob eine Hormontherapieresistenz auf eine  
15 veränderte Expression der erfindungsgemäßen AR42 und/oder AR32 zurückzuführen ist. Die erfindungsgemäßen Antikörper können auch in anderen Immuntests wie z.B. einem ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) oder in Radioimmuntests eingesetzt werden. So kann die Konzentration an erfindungsgemäßen AR42 und AR32 in Gewebe- oder Zellextrakten nachgewiesen werden.

20

Der Nachweis der Expression von AR42 oder AR32 kann auch über den Nachweis von mRNA in den Zellen erfolgen. Gegenstand der Erfindung ist daher auch die Verwendung einer Sonde mit Nukleinsäuresequenzen, die komplementär zu den Nukleinsäuresequenzen sind, die für die erfindungsgemäßen Peptide kodieren, zur Herstellung eines Reagenz zum Nachweis der  
25 Gegenwart von erfindungsgemäßer mRNA in Tumorzellen. Eine Sonde ist ein kurzes DNA-Stück mit mindestens 14 Nukleotiden. Die erfindungsgemäßen Sonden können z.B. in einer Northern Blot Analyse verwendet werden. Diese Methode ist z.B. in Sambrook, J. et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben. Andere Methoden zum Nachweis der RNA sind In Situ Hybridisierung, RNase Protection Assay oder PCR.

30

Weiterhin sind Gegenstand der Erfindung Vektoren die mindestens eine Kopie einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure enthält. Vektoren können prokaryontische oder eukaryontische Vektoren sein. Beispiele für Vektoren sind pPRO (Clontech), pBAD (Invitrogen), pSG5 (Stratagene), pCI (Promega), pIRES (Clontech), pBAC (Clontech), pMET (Invitrogen),  
35 pBlueBac (Invitrogen). In diese Vektoren kann mit den dem Fachmann bekannten Methoden die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eingefügt werden. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren befinden sich vorzugsweise in Verbindung mit Expressionssignalen wie z.B. Promotor und Enhancer auf dem Vektor.

5

10

Die Erfindung betrifft ferner Zellen, die mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder mit einem erfindungsgemäßen Vektor transfiziert sind. Als Zellen können z.B. *E. coli*, Hefe, *Pichia*, Sf9, COS, CV-1 oder BHK verwendet werden. Bevorzugt sind Zellen, die aus der Gruppe bestehend aus PC-3-Zellen, LNCaP-Zellen, CV-1-Zellen und Dunning-Zellen ausgewählt werden. Diese Zellen können sowohl für die Produktion von AR42 und /oder AR32 als auch für Zell-basierte Tests verwendet werden.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung

15

- a. einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure,
- b. eines erfindungsgemäßen Polypeptids,
- c. eines Peptids mit der in Seq ID NO 5 dargestellten Aminosäuresequenz oder
- d. einer erfindungsgemäßen Zelle

20

zur Identifizierung von Effektoren eines erfindungsgemäßen Polypeptids. Effektoren sind Substanzen, die auf das erfindungsgemäße Polypeptid inhibitorisch oder aktivierend wirken, und die in der Lage sind, die Androgenrezeptor-Funktion der erfindungsgemäßen Polypeptide zu beeinflussen.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Testsystem zur Detektion von Effektoren der erfindungsgemäßen Polypeptide, wobei

25

- a. in den erfindungsgemäßen Zellen ein Reportergen exprimiert wird und
- b. diese Zellen, wenn sie keinen oder nur wenig eines erfindungsgemäßen Polypeptids enthalten, zusätzlich mit einem erfindungsgemäßen Vektor transfiziert werden,
- c. die Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit der Testsubstanzen kultiviert werden und
- d. die Veränderung der Expression des Reportergens gemessen wird.

30

Ferner betrifft die Erfindung ein Testsystem zur Detektion von Testsubstanzen mit antiandrogener Aktivität, wobei

35

- a. in den erfindungsgemäßen Zellen ein Reportergen exprimiert wird und
- b. diese Zellen, wenn sie keinen oder nur wenig eines erfindungsgemäßen Polypeptids enthalten, zusätzlich mit einem erfindungsgemäßen Vektor transfiziert werden,
- c. die Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit der Testsubstanzen bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Androgens kultiviert werden und
- d. die Veränderung der Expression des Reportergens gemessen wird



5 Für ein erfindungsgemäßes Testsystem werden geeignete Zellen, zum Beispiel CV-1-Zellen, COS-Zellen oder Zellen, die aus der Prostata stammen, stabil oder transient mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder mit Teilen davon oder mit Teilen davon in Kombination mit einer Transaktivierungsdomäne von anderen Faktoren transfiziert. Teile einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure können z.B. die Liganden-bindende Domäne, die

10 Transaktivierungsdomäne und die DNA-bindende Domäne sein. Transaktivierungsdomänen von anderen Faktoren können z.B. die Liganden-bindende Domäne, die Transaktivierungsdomäne und die DNA-bindende Domäne des AR oder des Progesteronrezeptors, die Gal 4- Transaktivierungsdomäne oder die VP16-Transaktivierungsdomäne sein. Reporter-Plasmide können cotransfiziert werden. Diese

15 beinhalten ein oder mehrere Steroid-Response Elemente, die Inverted Repeats der TGTTCT-Sequenz mit einem Spacer von drei Basenpaaren darstellen. Weiterhin können solche Response Elemente Direct Repeats der TGTTCT-Sequenz mit einem Spacer von drei bis fünf Basenpaaren sein. Abweichungen in der TGTTCT-Sequenz, wie in natürlichen Response Elements beschrieben, sind möglich (Kokontis, J. M. und Liao, S., Vitam. Horm. 1999, 55, 219-

20 307). Stromabwärts liegt, in operativer Verknüpfung, ein minimal Promoter (Schenborn, E. und Groskreutz, D., Mol. Biotechnol. 1999, 13, 29-44) und ein heterologes Reportergen. Reporter-Plasmide können auch ein Promotor- oder Promotor-Teile aus bekannten androgenregulierten Gene beinhalten. Bevorzugt werden Gene die in der Prostata androgenabhängig exprimiert werden. Beispiele dafür sind das PSA-, Probasin- und C3(1)-Gen. Reportergene können z.B.

25 sein Luciferase-Gen, Chloramphenicolacetyltransferasegen, Urokinasegen, Green Fluorescence Protein-Gen und  $\beta$ -Galaktosidasegen. Die Testsubstanzen werden bevorzugt aus der Gruppe der Androgen-Derivate ausgewählt. Diese Testsysteme können aber auch zum

Screenen von großen Substanzbibliotheken eingesetzt werden. Für das Testsystem zur Detektion von Testsubstanzen mit antiandrogener Aktivität können in Schritt c. als Androgen

30 z.B. R1881, Testosteron, Dihydrotestosteron und Testosteron-Derivate verwendet werden. Bevorzugt werden solche Substanzen, die in einem erfindungsgemäßen Testsystem die Expression eines Reportergens verändern, aber nicht Effektoren des AR sind. Zur Bestimmung, ob die Substanzen Effektoren des AR sind, kann ein Testsystem verwendet werden, das analog zu dem erfindungsgemäßen Testsystem aufgebaut ist, wobei die Zellen

35 statt mit einem erfindungsgemäßen Vektor mit einem Vektor, der die Nukleinsäure des AR enthält, transfiziert werden.

Effektoren, die die erfindungsgemäßen Polypeptide aber nicht den AR aktivieren, führen durch Heterodimerbildung der erfindungsgemäßen Polypeptide mit dem AR zu einer Inhibition des

- 5 Effektoren, die die erfindungsgemäßen Polypeptide aber nicht den AR aktivieren, führen durch Heterodimerbildung der erfindungsgemäßen Polypeptide mit dem AR zu einer Inhibition des AR. Diese inhibitorische Wirkung läßt sich mit einem in Beispiel 5 beschriebenen Testsystem bestimmen. Eine Inhibition des AR ist wünschenswert bei allen Androgen-abhängigen Erkrankungen, z.B. zur Behandlung von Prostata-Tumoren und auch bei der männlichen
- 10 Fertilitätskontrolle. Bei der männliche Fertilitätskontrolle kann durch Inhibition des AR z.B. die Expression von Genen, die für die Bildung reifer Spermien notwendig sind, inhibiert werden.

Weiterhin können Gene identifiziert werden, die selektiv durch Homodimere oder Heterodimere der erfindungsgemäßen Polypeptide reguliert werden. Diese Gene können durch gezielte

15 Knock-Out und Knock-In Experimente identifiziert werden.

Die Erfindung liefert ferner ein Verfahren zur Bereitstellung pharmazeutisch wirksamer Substanzen wobei

- 20 a. die zu testende Substanzen mit einem erfindungsgemäßen Testsystem in Kontakt gebracht werden,
- b. die Wirkung der Substanzen auf das Testsystem im Vergleich zu Kontrollen gemessen wird und
- c. eine Substanz, die in Schritt b. eine Modulation der Expression des heterologen
- 25 Polypeptids zeigt, identifiziert wird.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Bereitstellung eines pharmazeutischen Mittels, wobei

- 30 a. die zu testende Substanzen mit einem erfindungsgemäßen Testsystem in Kontakt gebracht werden,
- b. die Wirkung der Substanzen auf das Testsystem gegebenenfalls im Vergleich zu Kontrollen gemessen wird,
- c. eine Substanz, die in Schritt b. eine Modulation der Expression des heterologen Polypeptids zeigt, identifiziert wird
- 35 d. und die in Schritt c. identifizierte Substanz mit der in der Pharmazie üblichen Formulierungsstoffen gemischt wird.

Die Erfindung liefert ferner ein Verfahren zur Bereitstellung eines pharmazeutischen Mittels, wobei

- 5        a. Substanzen mit einem erfindungsgemäßen Testsystem in Kontakt gebracht werden,
- b. die Wirkung der Substanzen auf das Testsystem im Vergleich zu Kontrollen gemessen wird,
- c. eine Substanz, die in Schritt b. eine Modulation der Expression des heterologen Polypeptids zeigt, identifiziert wird,
- 10       d. die in Schritt c. identifizierte Substanz gegebenenfalls optimiert wird und
- e. diese gegebenenfalls optimierte Substanz mit in der Pharmazie üblichen Formulierungsstoffen gemischt wird.

Bevorzugt sind Substanzen, die in den erfindungsgemäßen Testsystemen die Reporter-  
 15 Aktivität mindestens 10-fach steigern oder inhibieren. Eine Substanz, die durch ein erfindungsgemäßes Verfahren identifiziert wird, kann gegebenenfalls bezüglich metabolischer Stabilität, Aktivität in einem erfindungsgemäßen Testsystem und/oder Bioverfügbarkeit optimiert werden. Dafür können in der Chemie gängige Methoden verwendet werden.

Die bevorzugten Zubereitungen bestehen in einer Darreichungsform, die zur oralen, enteralen  
 20 oder parenteralen Applikation geeignet ist. Solche Darreichungsformen sind beispielsweise Tabletten, Filmtabletten, Dragees, Pillen, Kapseln, Pulver oder Depotformen sowie Suppositorien. Entsprechende Tabletten können beispielsweise durch Mischen des Wirkstoffs mit bekannten Hilfsstoffen, beispielweise inerten Verdünnungsmitteln wie Dextrose, Zucker, Sorbit, Mannit, Polyvinylpyrrolidon, Sprengmitteln wie Maisstärke oder Alginsäure, Bindemitteln  
 25 wie Stärke oder Gelatine, Gleitmittel wie Carboxypolymethylen, Carboxymethylcellulose, Celluloseacetatphthalat oder Polyvinylacetat, erhalten werden. Die Tabletten können auch aus mehreren Schichten bestehen.

Entsprechend können Dragees durch Überziehen von analog den Tabletten hergestellten  
 Kernen mit üblicherweise in Drageeüberzügen verwendeten Mitteln, beispielweise  
 30 Polyvinylpyrrolidon oder Schellack, Gummiarabicum, Talk, Titanoxid oder Zucker, hergestellt werden. Dabei kann auch die Drageehülle aus mehreren Schichten bestehen, wobei die oben bei den Tabletten erwähnten Hilfsstoffe verwendet werden können. Wirkstoffe enthaltende Kapseln können beispielsweise hergestellt werden, indem man den Wirkstoff mit einem inerten Träger wie Milchzucker oder Sorbit mischt und in Gelatinekapseln einkapselt. Die  
 35 erfindungsgemäßen Substanzen können auch in geeigneten Lösungen wie beispielsweise physiologischer Kochsalzlösung, als Infusions- oder Injektionslösung zur Anwendung kommen. Für die parenterale Applikation sind insbesondere ölige Lösungen, wie zum Beispiel Lösungen in Sesamöl, Rizinusöl und Baumwollsaamenöl, geeignet. Zur Erhöhung der Löslichkeit können

- 5    Lösungsvermittler, wie zum Beispiel Benzylbenzoat oder Benzylalkohol, zugesetzt werden. Es ist auch möglich, die über das erfindungsgemäße Verfahren erhältlichen und erhaltenen Substanzen in ein Transdermales System einzuarbeiten und sie damit transdermal zu applizieren.
- 10   Das erfindungsgemäße pharmazeutischen Mittel kann zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung von Androgen-abhängigen Erkrankungen verwendet werden. Solche Erkrankungen können z.B. Prostata-Karzinom oder Hoden-Tumor sein.

Das erfindungsgemäße pharmazeutischen Mittel kann zur Herstellung eines Medikaments für  
15   die männliche Fertilitätskontrolle verwendet werden.

Androgen-abhängige Erkrankungen können einerseits wie oben beschrieben durch Effektoren der erfindungsgemäßen Polypeptide beeinflusst werden, andererseits aber auch durch eine Änderung der Konzentration der erfindungsgemäßen Polypeptide in den betroffenen  
20   Geweben. Dazu kann entweder eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Hilfe eines in der Gentherapie gebräuchlichen Vektors oder ein erfindungsgemäßes Polypeptid in das Gewebe gebracht werden. Bei der Gentherapie wird ein Vektor, der eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthält, konstruiert und appliziert. Beispiele sind Vektoren, die aus Adenovirus, Adenovirus-associated virus, Herpes simplex virus oder SV40 abgeleitet sind. Die Gentherapie  
25   kann nach einem Protokoll wie von Gomez-Navarro, J. et al. (Eur. J. Cancer 1999, 35, 867-885) beschrieben durchgeführt werden. Die Applikation kann lokal, d.h. direkt in das betroffene Gewebe wie z.B. den Prostatatumor oder systemisch, d.h. über den Blutkreislauf erfolgen. Dies  
führt zu einer erhöhten Expression des erfindungsgemäßen Polypeptids.

Die Applikation eines erfindungsgemäßen Polypeptids kann in Form eines Fusionspolypeptids  
30   erfolgen. Durch das fusionierte Polypeptid, z.B. EGF oder Transferrin wird das erfindungsgemäße Polypeptid bevorzugt zu dem gewünschten Gewebe, z.B. dem Prostatatumorgewebe transportiert.

## 5 Beschreibung der Abbildungen

- FIG. 1 zeigt die Intron-Exon-Struktur des AR-Gens und die Domänenstruktur des AR, AR42 und des AR32. Im Gen wurden der bekannte Transkriptionsstart (tsp) im Promoter und der putative 2. Transkriptionsstart (?tsp) vor dem Exon 1B mit Pfeilen gezeigt. Das neue Exon 1B ist straffiert. Sterne markieren Splicingereignisse die spezifisch zu der Generierung der mRNA für AR42 und AR32 führen. Im Protein wurden die verschiedenen Domänen gezeigt. Die neuen Regionen, die in AR42 und AR32 durch das alternative Splicing des AR-Gens dazukommen, sind straffiert.
- FIG. 2 zeigt die Gewebe-Verteilung von AR42 und AR32 mRNA. Ein Sense Primer, der gegen das spezifische AR42 und AR32 Exon und ein Antisense Primer, der gegen die gemeinsame C-terminale Region gerichtet waren, wurden für die PCR-Amplifizierung verwendet. Gesamt-RNA wurde aus verschiedenen humanen Geweben gewonnen und mit einer Reverse Transkriptase umgeschrieben. Diese First-Strand cDNA diente als Template. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel getrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die AR42 cDNA ist als starke Bande und die AR32 cDNA als sehr schwache Bande auf dem Gel zu erkennen.

## 5 Beispiele

Die in den Beispielen verwendeten molekularbiologischen Methoden wie z.B. Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Herstellung von cDNA, Klonierung von DNA, Sequenzierung von DNA, wurden wie in bekannten Lehrbüchern wie zum Beispiel in Molecular Cloning, A Laboratory  
 10 Manual (Sambrook, J. et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) beschrieben, durchgeführt.

### Beispiel 1: Identifizierung und Klonierung von AR42 und AR32

Ausgangsmaterial war 1 µg gesamt-RNA aus humaner Placenta, die mittels des SMART RACE  
 15 Amplification kits (Clontech) in cDNA umgewandelt wurde. Für die PCR-Amplifikation wurde der Advantage-2 PCR kit (Clontech) benutzt zusammen mit einem Antisense Primer (5'-CAGATTACCAAGCTTCAGCTTCCG-3'), der gegen die Hinge-Region des humanen Androgenrezeptors gerichtet ist, und einem Sense 5'-Smart II Primers verwendet. Die Reaktionsbedingungen waren: 5 Sek. 94 °C, 3 Min. 72 °C (5 Zyklen); 5 Sek. 94 °C, 10 Sek. 70  
 20 °C, 3 Min. 72 °C (5 Zyklen); 5 Sek. 94 °C, 10 Sek. 68 °C, 3 Min. 72 °C (27 Zyklen). Hierbei wurde ein Fragment von ca. 500 Basenpaaren amplifiziert, auf Agarosegel gereinigt, in das PCR-TOPO-Plasmid (Invitrogen) kloniert und sequenziert. Die DNA-Sequenz zeigte, daß die komplette DNA-bindende Domäne des Androgenrezeptors vorhanden war (entspricht Exon 2 und 3 im Androgenrezeptorgen). Zusätzlich war unmittelbar vor dem Exon 2 eine neue  
 25 Sequenz angeknüpft. Dieser Abschnitt, den man als Exon 1B bezeichnen kann, beinhaltet ca. 160 Basenpaare aus dem untranslatiertem Bereich und eine kurze, für 7 Aminosäuren kodierende neue Sequenz. Um die komplette cDNA zu isolieren, wurden die Sense Primer 5'-  
 30 ACAGGGAACCAGGGAAACGAATGCAGAGTGCTCCTGACATTGCCTGT-3' (Endkonzentration 0,2 µM) und 5'-GACAGGGAACCAGGGAAACGAATG-3' (Endkonzentration 1 µM), die aus dem neuen Exon 1B-Bereich stammen, und ein Antisense Primer (5'-TCACTGGGTGTGGAAATAGATGGGCTTGA-3'), der für das C-terminale Ende des bekannten AR kodiert, synthetisiert. Die vorgegebenen Bedingungen für die SMART-PCR wurden verwendet. Damit ist es möglich, ein Fragment von ca. 1200 Basenpaaren aus der gleichen  
 35 Placenta cDNA zu amplifizieren und zu klonieren. Nach DNA Sequenzierung stellte sich heraus, daß es sich um zwei verschiedene Fragmente handelte, wie in Seq ID NO 1 und NO 3 gezeigt. In beiden war der neue, dem Exon 1B-entsprechenden Teil vorhanden. Der Unterschied zwischen AR42 und AR32 lag im C-terminale Bereich, da in AR32 die Region, die durch Exon 7 kodiert wird, fehlte. Eine Suche in genomischen Datenbanken zeigte, daß der

- 5 neue Exon 1B-Bereich mitten im ersten Intron des Androgenrezeptorgens liegt. Eine Analyse des davor liegenden Genabschnitts zeigt, daß möglicherweise in dieser Region ein zweiter Promotor des Androgenrezeptorgens liegt. Dieser Abschnitt enthält putative Initiatorregionen, die zur Erkennung durch die basale Transkriptionsmaschinerie dienen, sowie mehrere putative Steroidhormon-responsive Elemente.

10

#### Beispiel 2: Gewebeverteilung von AR42 und AR32

- Die Gewebeverteilung wurde durch semi-quantitative PCR bestimmt. Die Primer, die für die Isolierung der kompletten AR42 und AR32-cDNA-Sequenzen benutzt wurden (Beispiel 1), wurden auch hier verwendet. In der Kontrolle wurden spezifische Primer für Beta-Actin verwendet (Sense Primer: 5'-TGACGGGGTTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3'; Antisense Primer: 5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG-3'). Gesamt-RNA aus den folgenden humanen Geweben wurde benutzt: Gehirn, Hoden, Niere, Leber, Uterus, Prostata, Lunge, Trachea, Muskel, Brust, Herz. Nach Umschreiben in First-Strand cDNA (Stratagene) wurde eine PCR-Analyse mit dem Adavantage-2 PCR kit (Clontech) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen waren: 5 Sek. 94 °C, 3 Min. 72 °C (5 Zyklen); 5 Sek. 94 °C, 10 Sek. 70 °C, 3 Min. 72 °C (5 Zyklen); 5 Sek. 94 °C, 10 Sek. 68 °C, 3 Min. 72 °C (20 Zyklen). Die Amplifikationsprodukte wurden auf einem 1%-Agarosegel getrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Ergebnisse zeigten, daß AR42 RNA am häufigsten im Herz, Muskel, Uterus und in der Prostata exprimiert war. Die AR32 RNA-Mengen waren allgemein gering und zeigten keine wesentlichen Unterschiede zwischen Geweben.

#### Beispiel 3: Expression von AR42 und AR32

- Für die Expression des gesamten AR42 bzw. AR32 wurde der kodierende Bereich in den Baculovirusexpressionsvektor pBlueBac4.5 (Invitrogen) eingefügt. Um Nachweis und Reinigung zu vereinfachen, erfolgte eine Fusion mit einem His-Tag. Nach Cotransfektion von Insektenzellen mit der Bac-N-Blue DNA wurden rekombinante Viren erzeugt, die durch eine PCR-Verfahren identifiziert wurden. Ein Phagenstock wurde dann angelegt und für weitere Transfektionen und Produktion des AR42 bzw. AR32 in größeren Mengen verwendet. Die Reinigung der His-getaggten Proteinen erfolgte über eine Nickel-Affinitätssäule.

35

#### Beispiel 4: Testsystem zum Auffinden von Effektoren

Es wird ein Vektor für die transiente Expression von AR42 bzw. AR32 im pSG5-Plasmid (Stratagene) gebaut. Dieser Vektor wird in CV-1- oder PC-3-Zellen transfiziert. Parallel dazu

- 5 wird ein Reporterplasmid, das eine oder mehrere Kopien eines Steroid-Response Elements oder eines selektiven Androgen-Response Elements enthält, gekoppelt an ein Luciferase Reportergen, cotransfiziert. Um spezifische Effektoren von AR42 bzw. AR32 zu finden, wird ein Hochdurchsatz-Screening von Substanzbanken durchgeführt. Substanzen die in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M oder weniger die Aktivität des Reportergens anschalten werden  
10 weiter bearbeitet. Das Suchen nach Rezeptorantagonisten wird in Gegenwart von  $10^{-9}$  M Androgen, z.B. R1881 durchgeführt. Substanzen die in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M oder weniger die Androgeninduktion mindestens halbieren werden ausgewählt.

Beispiel 5: Transreprimierende Aktivität von AR42 und AR32

- 15 Es wird ein Vektor für die transiente Expression von AR42, AR32 bzw. AR im pSG5-Plasmid (Stratagene) gebaut. Eine konstante Menge an pSG5-AR und unterschiedliche Mengen an pSG5-AR42 bzw. pSG5-AR32 werden in CV-1-Zellen transfiziert. In der Kontrolle wird ein pSG5-Plasmid, das eine irrelevante cDNA von ähnlicher Länge enthält, mit dem pSG5-AR cotransfiziert. Zusätzlich wird ein Reporterplasmid, das eine oder mehrere Kopien eines  
20 Steroid-Response Elements oder eines selektiven Androgen-Response Elements enthält, gekoppelt an ein Luciferase Reportergen, cotransfiziert. Nach Behandlung mit einem Androgen wird eine Erhöhung der Reportergenaktivität gemessen. Steigende Mengen an transfiziertem pSG5-AR42 oder pSG5-AR32 hemmen diese transaktivierenden Effekte von stimuliertem AR.



## 5 SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Schering AG

&lt;120&gt; Neue Androgenrezeptor-Varianten

10

&lt;130&gt; 52011

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

15

&lt;160&gt; 6

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

20

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1329

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

25 &lt;400&gt; 1

```

gctgcgagca gagagggggt cctcggaggt catctgttcc atcttcttgc ctatgcaa 60
gcctgcctga agctgctgga ggctggcttt gtaccggact ttgtacaggg aaccagggaa 120
acgaatgcag agtgctcctg acattgcctg tcactttttc ccatgatact ctggcttcac 180
agtttgagga ctgccaggga ccatgttttg ccatttgact attactttcc accccagaag 240
30 acctgcctga tctgtggaga tgaagcttct ggggtgcact atggagctct cacatgtgga 300
agctgcaagg tcttcttcaa aagagccgct gaagggaac agaagtacct gtgcgccagc 360
agaaatgatt gcactattga taaattccga aggaaaaatt gtccatcttg tcgtcttcgg 420
aaatgttatg aagcagggat gactctggga gcccggaagc tgaagaaact tggtaatctg 480
aaactacagg aggaaggaga ggcttccagc accaccagcc ccactgagga gacaaccag 540
35 aagctgacag tgtcacacat tgaaggctat gaatgtcagc ccatctttct gaatgtcctg 600
gaagccattg agccagggtg agtgtgtgct ggacacgaca acaaccagcc cgactccttt 660
gcagccttgc tctctagcct caatgaactg ggagagagac agcttgtaac cgtggtcaag 720
tgggccaagg ccttgccctg cttccgcaac ttacacgtgg acgaccagat ggctgtcatt 780
cagtactcct ggatggggct catggtgttt gccatgggct ggcgatcctt caccaatgtc 840
40 aactccagga tgcctactt cgcctctgat ctggttttca atgagtaccg catgcacaag 900
tcccggatgt acagccagtg tgtccgaatg aggcacctct ctcaagagtt tggatggctc 960
caaatcacc cccaggaatt cctgtgcatg aaagcactgc tactcttcag cattattcca 1020
gtggatgggc tgaaaaatca aaaattcttt gatgaacttc gaatgaacta catcaaggaa 1080
ctcgatcgta tcattgcatg caaaagaaaa aatcccatat cctgctcaag acgcttctac 1140
45 cagctcacca agctcctgga ctccgtgcag cctattgcga gagagctgca tcagttcact 1200
tttgacctgc taatcaagtc acacatgggt agcgtggact ttccggaaat gatggcagag 1260
atcatctctg tgcaagtgcc caagatcctt tctgggaaag tcaagcccat ctatttccac 1320
accagtgga 1329

```

50

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 388

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

55

&lt;400&gt; 2

```

Met Ile Leu Trp Leu His Ser Leu Glu Thr Ala Arg Asp His Val Leu
  1             5             10             15

```

60

```

Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly
      20             25             30

```

```

Asp Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys
      35             40             45

```

65

5	Lys	Val	Phe	Phe	Lys	Arg	Ala	Ala	Glu	Gly	Lys	Gln	Lys	Tyr	Leu	Cys	
	50						55					60					
	Ala	Ser	Arg	Asn	Asp	Cys	Thr	Ile	Asp	Lys	Phe	Arg	Arg	Lys	Asn	Cys	
10	65					70					75					80	
	Pro	Ser	Cys	Arg	Leu	Arg	Lys	Cys	Tyr	Glu	Ala	Gly	Met	Thr	Leu	Gly	
					85					90					95		
15	Ala	Arg	Lys	Leu	Lys	Lys	Leu	Gly	Asn	Leu	Lys	Leu	Gln	Glu	Glu	Gly	
				100					105					110			
	Glu	Ala	Ser	Ser	Thr	Thr	Ser	Pro	Thr	Glu	Glu	Thr	Thr	Gln	Lys	Leu	
			115					120					125				
20	Thr	Val	Ser	His	Ile	Glu	Gly	Tyr	Glu	Cys	Gln	Pro	Ile	Phe	Leu	Asn	
	130						135					140					
	Val	Leu	Glu	Ala	Ile	Glu	Pro	Gly	Val	Val	Cys	Ala	Gly	His	Asp	Asn	
25	145					150					155					160	
	Asn	Gln	Pro	Asp	Ser	Phe	Ala	Ala	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Asn	Glu	Leu	
					165					170					175		
30	Gly	Glu	Arg	Gln	Leu	Val	His	Val	Val	Lys	Trp	Ala	Lys	Ala	Leu	Pro	
				180					185					190			
	Gly	Phe	Arg	Asn	Leu	His	Val	Asp	Asp	Gln	Met	Ala	Val	Ile	Gln	Tyr	
			195					200					205				
35	Ser	Trp	Met	Gly	Leu	Met	Val	Phe	Ala	Met	Gly	Trp	Arg	Ser	Phe	Thr	
	210						215					220					
	Asn	Val	Asn	Ser	Arg	Met	Leu	Tyr	Phe	Ala	Pro	Asp	Leu	Val	Phe	Asn	
40	225					230					235					240	
	Glu	Tyr	Arg	Met	His	Lys	Ser	Arg	Met	Tyr	Ser	Gln	Cys	Val	Arg	Met	
					245					250					255		
45	Arg	His	Leu	Ser	Gln	Glu	Phe	Gly	Trp	Leu	Gln	Ile	Thr	Pro	Gln	Glu	
				260					265					270			
	Phe	Leu	Cys	Met	Lys	Ala	Leu	Leu	Leu	Phe	Ser	Ile	Ile	Pro	Val	Asp	
			275					280					285				
50	Gly	Leu	Lys	Asn	Gln	Lys	Phe	Phe	Asp	Glu	Leu	Arg	Met	Asn	Tyr	Ile	
	290						295					300					
	Lys	Glu	Leu	Asp	Arg	Ile	Ile	Ala	Cys	Lys	Arg	Lys	Asn	Pro	Thr	Ser	
55	305					310					315					320	
	Cys	Ser	Arg	Arg	Phe	Tyr	Gln	Leu	Thr	Lys	Leu	Leu	Asp	Ser	Val	Gln	
					325					330					335		
60	Pro	Ile	Ala	Arg	Glu	Leu	His	Gln	Phe	Thr	Phe	Asp	Leu	Leu	Ile	Lys	
				340					345					350			
	Ser	His	Met	Val	Ser	Val	Asp	Phe	Pro	Glu	Met	Met	Ala	Glu	Ile	Ile	
			355					360									

5 370 375 380

Phe His Thr Gln  
385

10  
<210> 3  
<211> 1171  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

15  
<400> 3  
gctgcgagca gagaggggtt cctcggaggt catctgttcc atcttcttgc ctatgcaaat 60  
gcctgcctga agctgctgga ggctggcttt gtaccggact ttgtacaggg aaccagggaa 120  
acgaatgcag agtgctcctg acattgcctg tcactttttc ccatgatact ctggcttcac 180  
20 agtttggaga ctgccaggga ccatgttttg cccattgact attactttcc accccagaag 240  
acctgcctga tctgtggaga tgaagcttct ggggtgtcact atggagctct cacatgtgga 300  
agctgcaagg tcttcttcaa aagagccgct gaagggaaac agaagtacct gtgcgccagc 360  
agaaatgatt gcactattga taaattccga aggaaaaatt gtccatcttg tctgtctcgg 420  
aaatgttatg aagcagggat gactctggga gcccgggaagc tgaagaaact tggtaatctg 480  
25 aaactacagg aggaaggaga ggcttcacagc accaccagcc ccactgagga gacaaccag 540  
agctgacag tgtcacacat tgaaggctat gaatgtcagc ccactcttct gaatgtcctg 600  
gaagccattg agccaggtgt agtgtgtgct ggacacgaca acaaccagcc cgactccttt 660  
gcagccttgc tctctagcct caatgaactg ggagagagac agcttgtaca cgtggtcaag 720  
30 tgggccaagg ccttgccctgg cttccgcaac ttacacgtgg acgaccagat ggctgtcatt 780  
cagtactcct ggatggggct catggtgttt gccatgggct ggcgatcctt caccaatgtc 840  
aactccagga tgctctactt cgccccctgat ctggttttca atgagtaccg catgcacaag 900  
tcccggatgt acagccagtg tgtccgaatg aggcacctct ctcaagagtt tggatggctc 960  
caaatacccc cccaggaatt cctgtgcatg aaagcactgc tactcttcag cattaattgc 1020  
gagagagctg catcagttca cttttgacct gctaatacaag tcacacatgg tgagcgtgga 1080  
35 ctttccggaa atgatggcag agatcatctc tgtgcaagtg cccaagatcc tttctgggaa 1140  
agtcaagccc atctatttcc acaccagtg a 1171

40  
<210> 4  
<211> 294  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

45  
<400> 4  
Met Ile Leu Trp Leu His Ser Leu Glu Thr Ala Arg Asp His Val Leu  
1 5 10 15  
Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly  
20 25 30  
50 Asp Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys  
35 40 45  
55 Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys  
50 55 60  
Ala Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys  
65 70 75 80  
60 Pro Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly  
85 90 95  
65 Ala Arg Lys Leu Lys Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly  
100 105 110

5 Glu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Pro Thr Glu Glu Thr Thr Gln Lys Leu  
     115                                    120                                    125  
     Thr Val Ser His Ile Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn  
         130                                    135                                    140  
 10 Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn  
     145                                    150                                    155                                    160  
 15 Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu  
                                     165                                    170                                    175  
     Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro  
                                     180                                    185                                    190  
 20 Gly Phe Arg Asn Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr  
                                     195                                    200                                    205  
     Ser Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr  
         210                                    215                                    220  
 25 Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn  
     225                                    230                                    235                                    240  
 30 Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met  
                                     245                                    250                                    255  
     Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu  
                                     260                                    265                                    270  
 35 Phe Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Asn Cys Glu Arg  
                                     275                                    280                                    285  
     Ala Ala Ser Val His Phe  
         290  
 40  
     <210> 5  
     <211> 10  
     <212> PRT  
 45 <213> Homo sapiens  
     <400> 5  
     Asn Cys Glu Arg Ala Ala Ser Val His Phe  
         1                                    5                                    10  
 50  
     <210> 6  
     <211> 7  
     <212> PRT  
 55 <213> Homo sapiens  
     <400> 6  
     Met Ile Leu Trp Leu His Ser  
         1                                    5  
 60

## 5 Ansprüche

1. Nukleinsäure, die für einen Androgenrezeptor kodiert, dadurch gekennzeichnet, daß sie
  - a. die in Seq ID NO 1 und/oder 3 dargestellten Nukleotidsequenzen,
  - b. eine der Sequenz aus a. im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes
  - 10 c. eine mit den Sequenzen aus a. und/oder b. unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.
- 15 2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Protein-kodierenden Abschnitt der in Seq ID NO 1 oder/und 3 dargestellten Nukleinsäuresequenzen umfaßt.
3. Nukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Polypeptid mit der in Seq ID NO 2
- 20 oder/und 4 dargestellten Aminosäuresequenz kodiert.
4. Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es von einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-3 kodiert ist.
- 25 5. Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es die in Seq ID NO 2 oder 4 dargestellte Aminosäuresequenz umfaßt.
6. Peptid, dadurch gekennzeichnet, daß es die in Seq. ID NO 5 dargestellte Sequenz umfaßt.
- 30 7. Peptid, dadurch gekennzeichnet, daß es die in Seq ID NO 6 dargestellte Aminosäuresequenz umfaßt.
8. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 4 oder 5 oder eines Peptids nach Anspruch 6 oder/und 7 zur Herstellung von Antikörpern.
- 35 9. Antikörper gegen ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 4 oder 5 oder gegen ein Peptid nach Anspruch 6 oder 7.

- 5 10. Verwendung eines Antikörpers nach Anspruch 9 zur Detektion eines Polypeptids nach Anspruch 4 oder 5 in Tumorgewebe.
- 10 11. Verwendung einer Sonde mit Nukleinsäuresequenzen, die komplementär zu den Nukleinsäuresequenzen sind, die für die Peptide nach den Ansprüchen 6 oder 7 kodieren, zur Herstellung eines Reagenz zum Nachweis der Gegenwart von mRNA nach einem der Ansprüche 1 bis 3 in Tumorzellen.
12. Vektor, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-3 enthält.
- 15 13. Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-3 oder mit einem Vektor nach Anspruch 12 transfiziert ist.
- 20 14. Zelle nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus der Gruppe bestehend aus PC-3-Zellen, LNCaP-Zellen, CV-1-Zellen, CV-1-Zellen und Dunning-Zellen ausgewählt ist.
15. Verwendung einer Zelle nach Anspruch 13 oder 14 zur Expression der Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-3.
- 25 16. Verwendung
- a. einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
  - b. eines Polypeptids nach Anspruch 4 oder 5,
  - c. eines Peptids mit der in Seq ID NO 5 dargestellten Aminosäuresequenz oder
  - d. einer Zelle nach Anspruch 13 oder 14
- 30 zur Identifizierung von Effektoren eines Polypeptids nach Anspruch 4 oder 5.
17. Testsystem zur Detektion von Effektoren der erfindungsgemäßen Polypeptide, wobei
- a. in einer Zelle nach Anspruch 13 oder 14 ein Reportergen exprimiert wird und
  - b. diese Zelle, wenn sie keinen oder nur wenig eines Polypeptids nach Anspruch 4 oder 5 enthält, zusätzlich mit einem Vektor nach Anspruch 12 transfiziert wird,
  - c. die Zelle in Gegenwart oder Abwesenheit der Testsubstanzen kultiviert werden und
  - d. die Veränderung der Expression des Reportergens gemessen wird.
- 35

- 5 18. Testsystem zur Detektion von Testsubstanzen mit antiandrogener Aktivität, wobei
- a. in einer Zelle nach Anspruch 13 oder 14 ein Reportergen exprimiert wird und
  - b. diese Zellen, wenn sie keinen oder nur wenig eines Polypeptids nach Anspruch 4 oder 5 enthält, zusätzlich mit einem Vektor nach Anspruch 12 transfiziert wird,
  - c. die Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit der Testsubstanzen bei gleichzeitiger
  - 10 Anwesenheit eines Androgens kultiviert wird und
  - d. die Veränderung der Expression des Reportergens gemessen wird
19. Verfahren zur Bereitstellung pharmazeutisch wirksamer Substanzen, wobei
- a. Substanzen mit einem Testsystem nach Anspruch 17 oder 18 in Kontakt gebracht
  - 15 werden,
  - b. die Wirkung der Substanzen auf das Testsystem im Vergleich zu Kontrollen gemessen wird und
  - c. eine Substanz, die in Schritt b. eine Modulation der Expression des heterologen Polypeptids zeigt, identifiziert wird.
- 20
20. Verfahren zur Bereitstellung eines pharmazeutischen Mittels, wobei
- a. Substanzen mit einem Testsystem nach Anspruch 17 oder 18 in Kontakt gebracht werden,
  - b. die Wirkung der Substanzen auf das Testsystem im Vergleich zu Kontrollen
  - 25 gemessen wird,
  - c. eine Substanz, die in Schritt b. eine Modulation der Expression des heterologen Polypeptids zeigt, identifiziert wird
  - d. und die in Schritt c. identifizierte Substanz mit in der Pharmazie üblichen Formulierungsstoffen gemischt wird.
- 30
21. Verwendung einer nach Anspruch 19 bereitgestellten Substanz oder eines nach Anspruch 20 bereitgestellten pharmazeutischen Mittels zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung von Androgen-abhängigen Erkrankungen.
- 35
22. Verwendung einer nach Anspruch 19 bereitgestellten Substanz oder eines nach Anspruch 20 bereitgestellten pharmazeutischen Mittels zur Herstellung eines Medikaments für die männliche Fertilitätskontrolle.

5

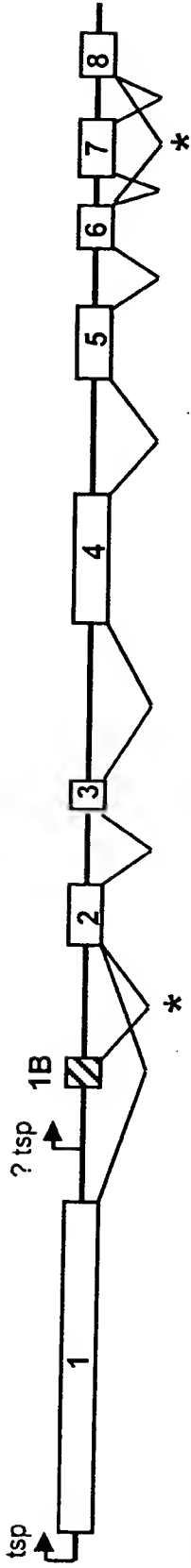
23. Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-3 in der Gentherapie von Androgen-abhängigen Erkrankungen.



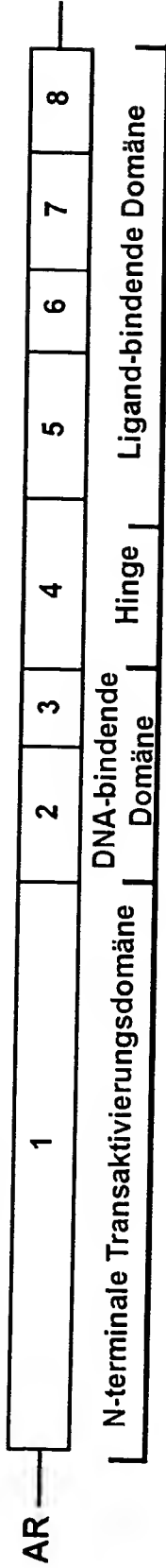
## 5 Zusammenfassung

Es werden zwei neue Varianten des Androgenrezeptors, AR42 und AR32, und ihre Verwendung beschrieben.

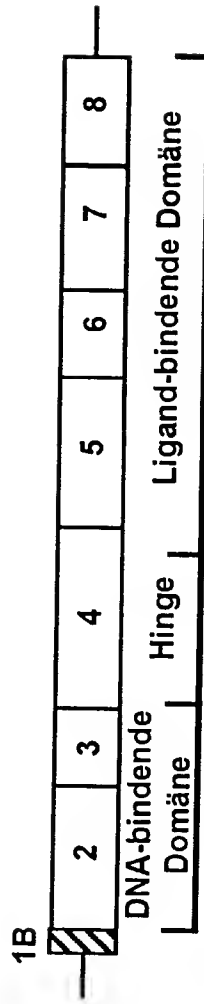
# Androgenrezeptor-Gen



## Androgenrezeptor-Proteine



### AR42



### AR32

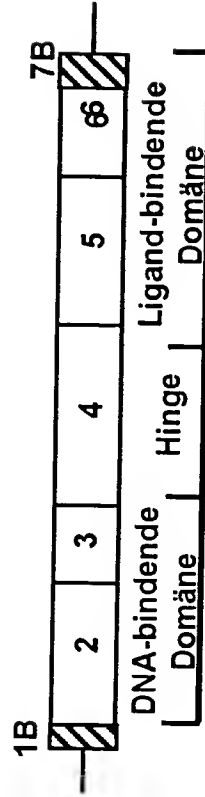


FIG. 1

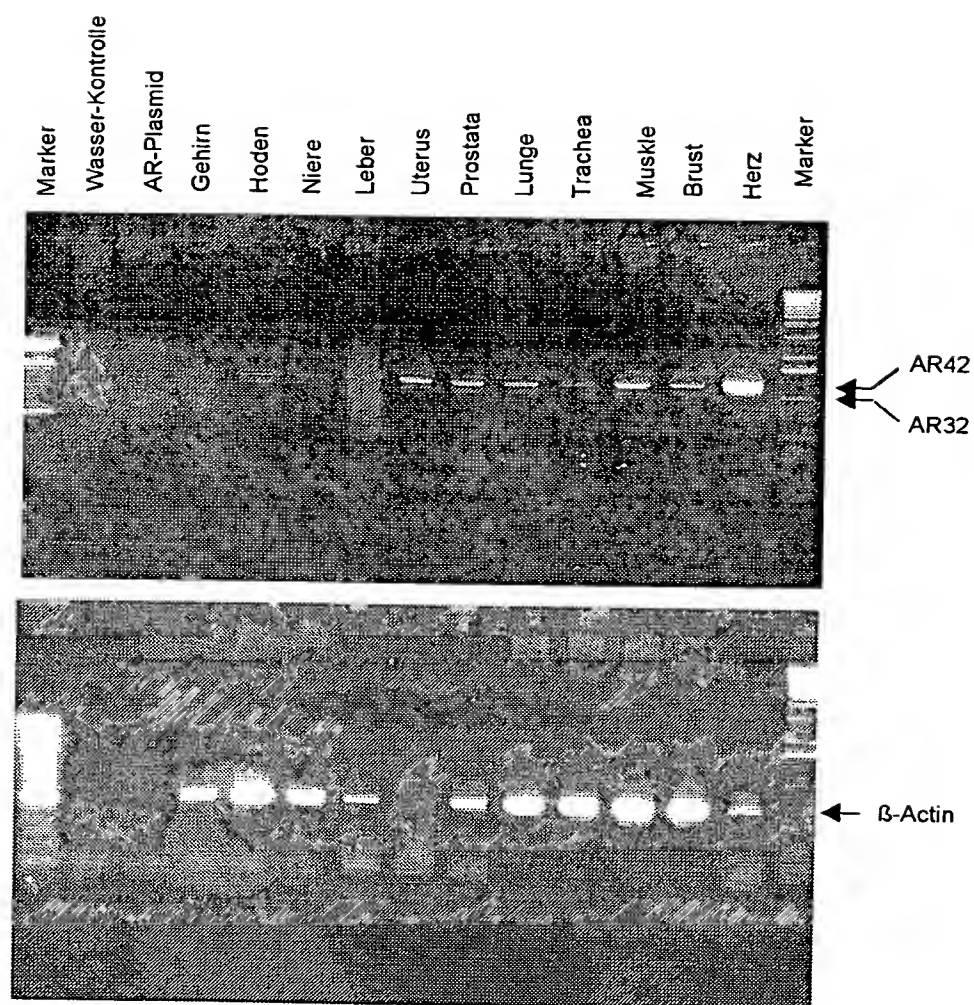


FIG. 2